



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47, A01N 63/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/37767</p> <p>(43) 国際公開日 1999年7月29日(29.07.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03328</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月24日(24.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/11281 1998年1月23日(23.01.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 若宮伸隆(WAKAMIYA, Nobutaka)[JP/JP] 〒567-0826 大阪府茨木市大池1丁目9-20 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 角田嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 Hyogo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, US</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL COLLECTIN</p> <p>(54)発明の名称 新規コレクチン</p> <p>(57) Abstract A gene encoding a novel collectin protein which is expected to exhibit an antibacterial activity, an antiviral activity, etc. particularly in the human body, and its amino acid sequence.</p>		

特にヒトの体内で、抗細菌、抗ウイルス活性などを発揮することが期待される新規コレクチンタンパク質をコードする遺伝子及びそのアミノ酸配列を開示する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シエラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	ML モリ	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MN モンゴル	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MR モーリタニア	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MW マラウイ	VN ヴェトナム
CH スイス	IN インド	MX メキシコ	YU ユーゴスラビア
CJ コートジボアール	IS アイスランド	NE ニジェール	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NL オランダ	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NO ノールウェー	
CU キューバ	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PL ポーランド	
CZ チェッコ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KR 韓国	RO ルーマニア	
		RU ロシア	

## 明 細 書

## 新規コレクチン

## 5 [技術分野]

本発明は、生体防御機構の解明に有用であり、また抗ウイルス活性などを含む生理活性を有することが期待され、医薬品用途への応用が可能であると考えられる、新規コレクチンに関する。

## 1 0 [背景技術]

コレクチンは、 $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD) 及びコラーゲン様領域を有するタンパク質の総称であり、細菌、ウイルスを始め様々な微生物に対する基礎免疫に関与していると考えられている。

- これまでに見出されているコレクチンとして、マンナン結合タンパク質 (MBP) 、サーファクタントタンパク質 A (SP-A) およびサーファクタントタンパク質 D (SP-D) 、コングルチニンなどを挙げることができる。これらのコレクチンは、図 1 (a) に示すような、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD) 、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び (4) システインを含む N 末端領域の 4 種の特徴的な領域を含む基本構造から構成されていることが知られており [Malhortra ら、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.) 、22 巻、1437~1445 頁、1992 年] 、この基本構造 3 個がコラーゲン様領域においてトリプルヘリックスを構成することによりサブユニットを形成し、さらにこのサブユニットが 3 量体、4 量体、6 量体等のオリゴマー構造を形成している。

脊椎動物では、細胞を介する免疫応答および特異的抗体反応によるメ

## 2

カニズムが、病原菌、ウイルスなどの侵入に対する最大の生体防御システムと考えられている。最近になって、コングルチニン等のレクチンによる非特異的な免疫応答への関与が示唆され、例えば、母親の移行抗体や特異的防御システムが十分に発達していない小児に対し、種々の微生物の中和作用や排除に重要な役割を果たしているとの報告がなされている〔Superら、ランセット (Lancet)、2巻、1236～1239頁、1989年〕。さらに、宿主の生体防御におけるこれらレクチンの役割について、例えば、MBPの遺伝子上の変異に起因したMBPの血中濃度の低下によって、宿主が感染を受けやすくなるという研究結果が報告されている〔Sumiyaら、ランセット、337巻、1569～1570頁、1991年〕。

本発明者らのグループは、以前に、コングルチニンおよびマンナン結合タンパク質が、H1およびH3タイプのインフルエンザAウイルスの感染や赤血球凝集活性を阻害することを見出した〔Wakamiyaら、グライココンジュゲイト・ジャーナル (Glycoconjugate J.)、8巻、235頁、1991年；Wakamiyaら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Comm.)、187巻、1270～1278頁、1992年〕。

その後さらに、コングルチニンをコードするcDNAクローンを取得し、コングルチニンと種々のサーファクタントタンパク質D遺伝子との間の強い関連性も見出されている〔Suzukiら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、191巻、335～342頁、1993年〕。

このように、コレクチンは、生体防御機構の解明における有用性及び生理活性医薬物質としての有用性などが期待される物質であるが、このファミリーに属するさらなる他分子種の存在についての報告はなされていないという現状にある。

## [発明の開示]

本発明は、かかる現状に鑑みてなされたものであり、特にヒトの体内で抗細菌、抗ウイルス活性などの生理活性を発揮することが期待される新規コレクチンを得ることを目的とするものである。

すなわち、本発明は、

- ① 配列番号：2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- ② 配列番号：1で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- 1 0 ③ Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe（配列番号：3）で示される、コレクチンタンパク質のコンセンサス配列と高い相同性を有する遺伝子クローンに基づいて作製されたプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、且つコレクチンタンパク質をコードするポリヌクレオチド、
- 1 5 ④ ①～③に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズでき、該ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が、（1） $Ca^{2+}$ 要求性の糖認識領域（CRD）、（2）ネック領域、（3）コラーゲン様領域、及び（4）システインを含むN末端領域を含む、ヒトコレクチンタンパク質であるポリヌクレオチド、
- 2 0 ⑤ ③または④に記載のポリヌクレオチドによってコードされるコレクチンタンパク質、
- ⑥ 配列番号：2で示されるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質、
- ⑦ 配列番号：1で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドによって
- 2 5 コードされるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質、ならびに
- ⑧ ⑤乃至⑦のいずれかに記載のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列に

- において、1または複数のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び(4) システインを含むN末端領域を含む、コレクチンタンパク質をその要旨とし、
- 5 コレクチンに特徴的な構造を有し、従来報告されているものとは異なる新規のコレクチン遺伝子及びタンパク質を提供するものである。

[図面の簡単な説明]

- 図1は、従来報告されている主なコレクチンの基本構造及びタンパク質の概観を示す図である。

図2は、従来報告されている3種のコレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

図3は、図2と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

- 図4は、本発明の新規コレクチンの塩基配列を決定するために使用した各プライマーの名称と、シーケンサーにより読み取られた塩基配列を示す図(b)及び得られたコレクチンのORFを示す図(a)である。

図5は、従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンのアミノ酸配列のアラインメントの前半部分を示す図である。

図6は、図5と同様のアラインメントの後半部分を示す図である。

- 図7は、従来報告されている3種のコレクチンと、本発明の新規コレクチンの基本構造、すなわち、(a) システインを含むN末端領域、(b) コラーゲン様領域、(c) ネック領域及び(d)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域の比較を示す模式図である。

- 図8は、本発明の新規コレクチンのゲノミックサザン分析の結果を示す図である。

図9は、本発明の新規コレクチンの臓器分布を示す、ヒトの種々の組

織、すなわち、(a) 心臓、(b) 脳、(c) 胎盤、(d) 肺、(e) 肝臓、(f) 骨格筋、(g) 腎臓及び(h) 脾臓に対するノーザン分析の結果を示す図である。

図 10 は、本発明の新規コレクチンの種間での保存性を示す、種々の脊椎動物、すなわち、(a) ヒト、(b) サル、(c) ラット、(d) マウス、(e) イヌ、(f) ウシ、(g) ウサギ及び(h) ニワトリにおけるゲノミックサザン分析の結果を示す図である。

図 11 は、種々のコレクチンの遺伝的系統樹を示す図である。

#### 10 [発明を実施するための最良の形態]

上記のごとき、本発明によって提供される新規コレクチン遺伝子及びタンパク質において、特に、前記③におけるプローブが、以下の塩基配列すなわち、TTTTGATGGAGGCTCCATACC (配列番号：7) 及び CTGCCAACACACTCATCGCTG (配列番号：8) で示される塩基配列を有するプライマーを用いて行ったPCR反応の増幅産物であることが、目的のコレクチンタンパク質をコードするポリヌクレオチドを取得するためには好ましい。

また、前記ポリヌクレオチドは、好ましくはcDNAである。

さらに、本発明のタンパク質は、ヒト由来であることが、ヒトの体内で抗細菌、抗ウイルス活性などを発揮できることが期待され、生理活性医薬物質としての有用性に鑑みて好ましい。従って、本発明のタンパク質は、ヒト由来のコレクチンタンパク質を企図するものであり、様々なヒト生体組織を検討したところ、有用と考えられるコレクチンタンパク質がヒト肝臓に発現されていることが示された。

上記③及び④におけるストリンジントなハイブリダイゼーション条件としては、例えば、5 x SSC (20 x SSC (3 M NaCl、0.3 Mクエン酸ナ

- トリウム) を4倍希釈することにより5 x SSCを調製)、1%ブロッキング剤(ベーリンガー・マンハイム社製)、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDSの溶液中で、68°Cにて1時間プレハイブリダイゼーション;cDNAプローブ(10 ng/ml)を含む5 x SSC、1%ブロッキング剤、
- 5 0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02% SDSの溶液中で、55°Cにて16時間ハイブリダイゼーション:2 x SSC/0.1%SDS溶液で5分間2回洗浄:55°Cにて、0.5 x SSC/0.1%SDS溶液で15分間2回洗浄を行う一連の処理工程を含むハイブリダイゼーションが含まれるが、当該技術分野における知識に基づき、溶液濃度や温度、時間等の条件を適宜に変更することができる。
- 10

また、上記⑧において、(4)システインを含むN末端領域には、システインが少なくとも1つ、好ましくは1つ含まれる。

- そして、上記⑧における、1または複数のアミノ酸の欠失、置換及び/または付加とは、コレクチンタンパク質の親水性・疎水性、酸性・塩
- 15 基性、含有基などに大幅な変化をきたさず、上記4種の領域、(特に
- (1)Ca<sup>2+</sup>要求性の糖認識領域(CRD)及び(3)コラーゲン様領域)の有する各々の特徴を変えることが少ない範囲でのアミノ酸の欠失、置換及び/または付加を称する。これまでに報告されているコレクチンファミリーのタンパク質のアミノ酸配列とその構造に基づき、例えば

- 20 (1)Ca<sup>2+</sup>要求性の糖認識領域(CRD)及び(2)ネック領域において1~10程度、(3)コラーゲン様領域において1~100程度、好ましくは1~15、ならびに(4)システインを含むN末端領域とシグナル配列において1~20程度のアミノ酸の欠失、置換及び/または付加が許容され
- ると考えられる。

- 25 以下に、本発明の新規コレクチンに関して、実施例に沿って詳細に説明するが、これら実施例の開示によって、本発明が限定的に解釈される



べきでないことは勿論である。

- すなわち、ESTデータベースの検索（実施例1）、スクリーニング用プローブの作製（実施例2）、ヒト肝臓由来cDNAライブラリーのスクリーニング（実施例3）、新規コレクチンの塩基配列の決定（実施例4）、
- 5 新規コレクチンのゲノミックサザン分析（実施例5）、新規コレクチンのヒトの種々の組織に対するノーザン分析（実施例6）、新規コレクチンの種々の動物種の組織についてのゲノミックサザン分析（実施例7）ならびに新規コレクチンの遺伝学的解析（実施例8）について以下に説明する。

#### 1 0      実施例1：ESTデータベースの検索

- 既知のコレクチンすなわち、MBP、SP-A及びSP-Dのアミノ酸配列（図2及び3参照、図中、相同と認められるアミノ酸残基部分に囲みを付した）を比較することにより、分子間に保存性の高い領域の検索を行った。
- この結果、ヒトMBPのアミノ酸配列における第220番目から246番目までの
- 1 5      27アミノ酸（図3、白抜文字部分）に保存性が高いことが明かとなったので、この領域に相当するコンセンサス配列をいくつか作成し、EST
- （Expressed Sequence Tags）データベースの検索を行った。ESTデータベースは、1996年10月11日に、676750件の配列を含むものを使用した。

- その結果、相同性の高いアミノ酸配列を含むデータがいくつか得られた。
- 2 0      得られたデータのアミノ酸配列についてGenBank/ESTデータベースの検索を行い、既知または未知物質のいずれであるかを判定した結果、コンセンサス配列として、

- Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe（配列番号：3）で示さ
- 2 5      れるアミノ酸配列を用いたときに得られたデータの中に、相同性は高いが未知の塩基配列を含むデータ（登録番号：R29493）を得ることができ

た。これは、22週令のヒト胎児肝臓cDNAライブラリー由来のクローン (F1-1006D) で、5'末端側の326塩基の配列を示すデータであった。

そこで、このデータのもとになるクローンを保有しているPohang Institute of Science & Technology (韓国、Pohang) のHee-Sup Shin氏  
5 に当該クローンを分譲していただいた。このクローンのインサートサイズは約600 bpで、5'末端側は配列番号：4に示される塩基配列に引き続き組み込まれ、3'末端はXhoIサイトでプラスミドpSK(-) (pBluescript IISK(-)) に組み込まれていた。

#### 実施例2：スクリーニング用プローブの作製

- 1 0 上記クローンのインサートをEcoRI及びXhoIで切り出し、pUC18に組み込み、プライマー (ファルマシア社製、M13 Universal Primer (配列番号：5、5'-フルオレセイン-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') 及びM13 Reverse Primer (配列番号：6、5'-フルオレセイン-CAGGAAACAGCTATGAC-3')) で塩基配列を決定した。
- 1 5 この塩基配列から読取枠をコレクチンのアミノ酸配列に合わせて、そこから読み取ることができるアミノ酸配列に相当する塩基配列を抽出し、この一部分に相当するジゴキシゲニン (DIG) ラベルcDNAプローブ用プライマー (Reverse プライマー、配列番号：7及びForward プライマー、配列番号：8) を、アプライドバイオシステムズ社製392A DNA/RNAシンセサイザーを用いて作製した。DIGラベルは、PCR DIGプローブ合成キット (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。反応組成は以下のとおりである (クローン (F1-1006D) のインサートをEcoRI及びXhoIで切り出した DNA断片 (4.4 ng/ $\mu$ l) : 12  $\mu$ l (52.8 ng)、10 x 緩衝液: 5  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> : 5  $\mu$ l、dNTP (PCRラベリングミックス) : 2.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M Reverseプライマー : 2.5  $\mu$ l、20  $\mu$ M Forward プライマー: 5  $\mu$ l、H<sub>2</sub>O : 18  $\mu$ l、Taq ポリメラーゼ : 0.5  $\mu$ l)。PCR反応は、ア

トー社製ザイモリアクターを用いて、92℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 2 分のサイクルを35回行った。

### 実施例 3 : ヒト肝臓由来cDNAライブラリーのスクリーニング

- 5 5 先ず、以下のようにファージcDNAライブラリーのタイトレーションを行った。mLB培地 (10 mM MgSO<sub>4</sub> 及び0.2%マルトースを含むLB培地 (1 g トリプトン、0.5 g イーストエキストラクト、0.5 g NaCl/100 ml) で37℃にて16時間培養したEscherichia coli Y1090r<sup>-</sup> 0.2 mlと、SM 緩衝液 (5.8 g NaCl、2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、2 M Tris-HCl (pH 7.5) 25 ml、5 ml 2%ゼラチン/L) で段階希釈したcDNAライブラリー0.1 mlを37℃15分インキュベートし、その後2.5 mlのLB-TOP アガー (0.75%アガー/LB培地) に加え均一とし、90mmφ LB培地プレート (岩城硝子社製) (1.5%アガー/LB培地) にまいた。15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションした。各プレートのブラックを計数後、ファージのタイターを計算により求めた。その結果、タイターは $2.3 \times 10^{11}$  pfu/mlであった。
- 1 0 1.5 このようにタイトレーションを行ったcDNAライブラリーにつき、実施例2で作製したプローブを用いて以下の通りにスクリーニングを行った。

- 2 0 mLB培地で37℃にて16時間培養したEscherichia coli Y1090r<sup>-</sup> 0.6mlとSM 緩衝液で希釈したcDNAライブラリー $1 \times 10^5$  pfuを、37℃にて15分インキュベートし、その後7.5 ml LB-TOP アガロース (0.75%アガロース) に加えて均一とした。これを140 mm<sup>2</sup>のLB培地角プレート (日本製薬社製) にまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42℃にて5時間インキュベーションした。ブラック形成を確認後、次に、ナイロンメンブレンへの転写を行った。転写は、ナイトラン (Nytran) 13N (2 5 シュライヒャーアンドシュウェル社製 (Schleicher and Schuell Co.) ) を用いて行った。12.5 cm x 9.0 cmのフィルターを蒸留水に浸けて10

分間湿らせた後、ワットマン3MM紙上において余分な水分を除去し、ブ  
ラークを形成したプレート上にフィルターを置いた。2分間放置した後、  
フィルターを剥がし、10分間風乾させた。0.2 M NaOH/1.5 M NaClにより  
2分間ファージDNAを変性させ、0.4 M Tris-HCl (pH7.6) / 2 x SSCで2  
5 分間中和し、2 x SSCで2分間洗浄を行った。その後、GS GENE LINKER (バ  
イオラッド社製) で紫外線照射することによりメンブレンに固定した。  
ハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出は以下の様に行った。  
フィルターを2 x SSCで湿らせ、余分な水分をワットマン3MM紙で除去し、  
ハイブリダイゼーションバックに移しハイブリダイゼーション溶液 (5  
1 0 x SSC、1%ブロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.02%  
SDS) と68°Cにて1時間プレハイブリダイゼーションを行った。続いて、  
バックからハイブリダイゼーション溶液を除き、そこへDIGでラベルし  
たcDNAプローブを10 ng/mlになるように調製したハイブリダイゼーシ  
ョン溶液を加え、55°Cにて16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイ  
1 5 ブリダイゼーション終了後、フィルターは室温にて2 x SSC/0.1%SDS溶  
液で5分間、2回洗浄し、55°Cにて、0.5 x SSC/0.1%SDS溶液で15分間  
2回洗浄した。次にDIG緩衝液I (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5  
)) で1分間、SDSを除去し、DIG緩衝液II (1%ブロッキング剤、DIG  
緩衝液I) で30分間、フィルターのブロッキングを行った。DIG緩衝液I  
2 0 で1分間洗浄し、次いでDIG緩衝液IIで抗DIGアルカリフォスファターゼ  
標識抗体 (ベーリンガー・マンハイム社製) を5000倍希釈した溶液を加  
えて、30分間抗体反応を室温で行った後、室温でDIG緩衝液Iで15分間2  
回洗浄した。DIG緩衝液III (100 mM Tris-HCl、100 mM NaCl (pH 9.5)  
、50 mM MgCl<sub>2</sub>) で3分間処理することによりMg<sup>2+</sup>の濃度を高め、NBT  
2 5 /BCIP (和光純薬社製) をDIG緩衝液IIIに加えた溶液で発色させたところ  
、13個の陽性クローンが得られた。これらのクローンに相当するブラ

- ークをプレートから切り出し、SM緩衝液1 mlを入れたチューブに加え、10分間攪拌した後SM緩衝液で段階希釈し、この希釈液0.1 mlとmLB培地で37°C16時間培養したEscherichia coli Y1090r<sup>-</sup>0.2 mlを混ぜ、37°Cにて15分間インキュベートした。その後、混合液を2.5 ml LB-TOPアガロース
- 5 に加えて均一とし、90mmφLB培地プレートにまいたものを10枚作製し、15分間室温で固化させ、42°Cにて5時間インキュベーションし、いくつかのブランクを得、一次スクリーニングと同様にして二次スクリーニングを行った。

#### 実施例4：新規ヒトコレクチンの塩基配列の決定

- 1 0 二次スクリーニングで得られた陽性クローンのうち適切と考えられる2クローン (HL11-3M、HL11-9) のブランクをプレートから切り出し、SM緩衝液 1 mlを入れたチューブに加えて攪拌した後、50 μlをmLB培地で37°C16時間培養したEscherichia coli Y1090r<sup>-</sup>50 μlと共にmLB培地4.95 mlに加え、37°Cにて16時間培養した。クロロホルム1滴を加え、3分間
- 1 5 攪拌した後、10,000 rpmで5分間遠心分離し、上清を得た。

得られた上清を鋳型とし、TaKaRa LA PCR Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用い、PCRによりインサートDNAを増幅させた。PCRの反応組成は以下のとおりである (上清 : 11 μl、10 x LA PCR 緩衝液 11 (Mg<sup>++</sup> 不含) : 2.5 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> : 5 μl、dNTPミックス : 8 μl、20 μM λgt11

- 2 0 Reverseプライマー (配列番号 : 9、5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3') : 2.5 μl、20 μM λgt11 Forwardプライマー (配列番号 : 10、5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3') : 1 μl、LA Taq ポリメラーゼ : 0.5 μl、H<sub>2</sub>O : 全容量50 μlになるように添加)。PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社製ジーンAmp PCRシステム9600を用いて、98°C10秒、68°C5
- 2 5 分のサイクルを30回行った。PCR産物は、1%アガロースゲル電気泳動にて確認後、ゲルからの切り出しにより精製した。精製には、ファルマシ

ア社製Sephaglas BandPrep Kitを用いた。

切り出したDNA断片は、インビトロジェン社製TAクローニングキットのpCR2.1ベクターに組み込んだ。組換えたベクターは、インビトロジェン社製TAクローニングキットに含まれるTOP10F'細胞に形質転換した。形質

5 転換体をLB培地 (100  $\mu$ g/ml アンピシリン) で培養し、アルカリSDS法により各クローンにつき2種類 (HL11-3M-1、HL11-3M-2、HL11-9-1、HL11-9-2) のプラスミドを抽出し、ファルマシア社製 オートリード・シーケンシング・キットおよび A. L. F. オートシーケンサーで塩基配列の決定を行った。プライマーはまずオートリード・シーケンシング・キット添付

1 0 のM13 Universal Primer (配列番号: 5) およびM13 Reverse Primer (配列番号: 6) を用い、以後、明らかになった塩基配列をもとにFITC (ファルマシア社製 Fluore Prime) にてラベルした以下のプライマー

(3MU0~9R3) をDNA/RNAシンセサイザーを用いて作製し、全領域の配列を決定した。

- 1 5 3MU0: 5'-フルオレセイン-TAATGGTAGCGACCGGCGCT-3' (配列番号: 1 1)、  
3MU1: 5'-フルオレセイン-AAACCAATTTATACTCCTGG-3' (配列番号: 1 2)、  
3MU2: 5'-フルオレセイン-AATATTGGCAAGACTGGGCC-3' (配列番号: 1 3)、  
3MR1: 5'-フルオレセイン-GATGAGTGTGTTGGCAGCAT-3' (配列番号: 1 4)、  
3MR2: 5'-フルオレセイン-GTATCTTCCACAATCACAGA-3' (配列番号: 1 5)、  
2 0 3MR3: 5'-フルオレセイン-TTAATTCCTTTTCGGCCCCAT-3' (配列番号: 1 6)、  
3MR4: 5'-フルオレセイン-GCAAAAGAAATAGTACCAGG-3' (配列番号: 1 7)、  
3MR5: 5'-フルオレセイン-CATATCACCCAGTTCTCCTT-3' (配列番号: 1 8)、  
9U1 : 5'-フルオレセイン-AGCAGGGATTAGGGAACTG-3' (配列番号: 1 9)、  
9U3 : 5'-フルオレセイン-CTGTGAGCGTCATTACAGTT-3' (配列番号: 2 0)、  
2 5 9U4 : 5'-フルオレセイン-GGTTGTCTATATGTCAAATG-3' (配列番号: 2 1)、  
9U5 : 5'-フルオレセイン-TATGGCCATGGCTATACTTG-3' (配列番号: 2 2)、

7U3 : 5'-フルオレセイン-ATCGCTGACTATGTTGCCAA-3' (配列番号 : 2 3)、

9R1 : 5'-フルオレセイン-CAAGTATAGCCATGGCCATA-3' (配列番号 : 2 4)、

9R2 : 5'-フルオレセイン-AACTGTAATGACGCTCACAG-3' (配列番号 : 2 5)、

9R3 : 5'-フルオレセイン-CATTTGACATATGAACAACC-3' (配列番号 : 2 6)

- 5       その結果、得られたcDNAクローンは配列番号 : 1 に示される1295塩基を含み、831塩基のORF (転写解読枠) を有し、配列番号 : 2 に示される277のアミノ酸をコードしていた。

- この塩基配列決定における概略は、図4に示す通りである。図4 (a) に得られたコレクチンのORFが示され、この中のG-X-Yはコラーゲン様領域を表すものである。また、図4 (b) に、上記各プライマー名、シーケンサーにより読み取られた塩基配列 (矢印により表される)、ならびにM13 Universal Primer (Uで表される) およびM13 Reverse Primer (Rで表される) を示す。
- 1 0

- 図5及び6には、従来報告されている3種のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列と、本発明のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列のアライメントを示す。図2及び3と同様に、相同性を有するアミノ酸残基部分に囲みを付した。
- 1 5

- さらに、この新規コレクチンタンパク質の配列の構造的特徴について調べたところ、図7の模式図の通り、既知のコレクチン同様、(a) システインを含むN末端領域、(b) コラーゲン様領域、(c) ネック領域及び(d) 糖認識領域により構成されていることが示された。
- 2 0

- しかしながら、GenBankデータベースでDNA及びアミノ酸についての相同性の検索を行った結果によれば、得られたタンパク質の配列は、従来見出されているコレクチンとは異なる新規のコレクチンのものであることが明らかとなった。
- 2 5

#### 実施例5 : 新規コレクチンのゲノミックサザン分析

実施例 4 において明らかにされた cDNA 配列を有する新規コレクチンの遺伝子が、シングルコピー遺伝子であるかまたはマルチコピー遺伝子であるかを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を行った。

5 胎盤より抽出したゲノム DNA の 4  $\mu$ g 相当量を、制限酵素の EcoRI、Hind  
III、BamHI、XbaI または SacI で消化し、0.7% アガロースゲルにて、100  
mA で 3 時間電気泳動した。泳動終了後、ナイロンメンブレン (ナイトラ  
ン 13N) に転写して、分析用のメンブレンを作製した。転写は、先ず、電  
気泳動後のゲルを 100 ml の 0.25 N HCl に 10 分間浸し、蒸留水で 3 回洗浄  
した後、100 ml の変性液 (1.5 M NaCl、0.5 M NaOH) に 15 分間 2 回浸し  
10 、100 ml の中和液 (0.5 M Tris-HCl、3 M NaCl (pH 6.8)) に 30 分間浸  
すことによって脱プリン化、変性及び中和の処理を施し、次いでバキュー  
ームプロットティングシステム (東洋紡エンジニアリング社製、VB-30) を  
用いて転写した。この際、メンブレンは、2 x SSC に 5 分間、次に 20 x  
SSC に 5 分間浸漬して前処理したものをを用い、パッドは、20 x SSC をしみ  
15 こませたものを用いた。転写終了後、UV 照射により固定処理を施  
した。

サザン分析のためのハイブリダイゼーション用プローブとしては、実  
施例 4 で得られた新規コレクチンの cDNA 配列の ORF に相当する部分を、前  
記の PCR DIG プローブ合成キットを用いて DIG ラベルした DNA プローブを用  
20 いた。ハイブリダイゼーションの前に、プローブは 10 分間煮沸し、5 分  
間ドライアイス/エタノールで急速凍結処理しておいた。

先ず、転写後のメンブレンを 2 x SSC に 5 分間浸し、Expresslyb  
Hybridization Solution (クローンテック社製) 10 ml 中で 68°C にて 30 分  
間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記凍結処理後のプ  
25 ローブを Expresslyb Hybridization Solution で 10 ng/ml となるように希  
釈し、この溶液 2 ml を用いて、68°C にて 1 時間ハイブリダイゼーション



を行った。

ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで室温にて5分間ずつ2回振盪し、続いて0.2 x SSC、0.1% SDS溶液20 mlで68℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去するために、DIG緩衝液 I (100 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH 7.5)) 50 mlで室温にて1分間2回洗浄し、次にDIG緩衝液II' (1.5%ブロッキング剤、DIG緩衝液 I) 50 mlで室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2%Tween20を含むDIG緩衝液 I で5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体10 mlで30分間処理し、0.2%Tween 20を含むDIG緩衝液 I を50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPD (登録商標、ベーリンガー・マンハイム社製、化学発光基質) を全体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム57 (ボラロイド社製) 上で感光させた。

この結果、図8の各レーンに示されるように、各制限酵素で処理したゲノムDNAより、それぞれ1～2個のシグナルしか検出されないので、得られた新規コレクチン遺伝子がシングルコピー遺伝子であることが推測された。

## 2 0      実施例6：新規コレクチンのヒトの種々の組織についてのノーザン分析

本発明の新規コレクチンのmRNAの種々の組織における発現を調べるため、ノーザンハイブリダイゼーションにより解析を行った。

ハイブリダイゼーション用プローブとしては、得られた新規コレクチンのcDNA配列 (配列番号：1) のORFに相当する部分を、DIG RNAラベリングキット (SP6/T7、ベーリンガー・マンハイム社製) を用いてDIGラベ

ルしたRNAプローブを用い、また、メンブレンは、Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (クローンテック社製) を用いて実施した。このメンブレンは、ヒト (a) 心臓、(b) 脳、(c) 胎盤、(d) 肺、(e) 肝臓、(f) 骨格筋、(g) 腎臓、及び (h) 膵臓から得られたポリA<sup>+</sup> RNAをそれぞれ2  $\mu$ gずつ、1.2%ホルムアルデヒド変性アガロースゲルで電気泳動した後、電荷が改変されたナイロンメンブレンに転写し、UV照射により固定処理を施したものである。

5 以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。まず、2 x SSCにメンブレンを5分間浸し、  
1 0 10mlのハイブリダイゼーション溶液(5 x SSC、10 x デンハーツ溶液、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)、50%ホルムアミド、0.5% SDS、0.1 mg/mlサケ精子DNA) 中で65°Cにて3時間プレハイブリダイゼーションを行い、プローブ(10分間煮沸し、5分間ドライアイス-エタノールで急速凍結処理しておいたもの) を1  $\mu$ g/mlになるようにハイブリダイゼーション溶液で希釈して、この溶液2 mlを用いて65°Cにて18時間ハイブリダイゼーションを行った。

1 5 ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2x SSC、0.1%SDS溶液20 mlで室温にて5分間2回振盪し、続いて0.1 x SSC、0.1%SDS溶液20 mlで、68°Cにて15分間2回、振盪しながら行った。SDSを除去するために、50 mlのDIG緩衝液 I で室温にて1分間2回洗浄し、次に50 mlのDIG緩衝液II' で、室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2%Tween20を含むDIG緩衝液 I で5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファターゼ標識抗体を10 ml用いて30分間処理し、0.2%Tween20を含むDIG緩衝液 I を50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。  
2 0 た。10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPDを全  
2 5

体にゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム612（ボラロイド社製）上で感光させた。

- この結果を図9に示すが、本発明のコレクチンの、1.2 kbp及び3.8 kbpのmRNAが、肝臓（レーン e）及び胎盤（レーン c）で発現されており、特に肝臓において多量に発現が認められ、胎盤では若干量発現していることが明らかとなった。

#### 実施例7：新規コレクチンの種々の動物についてのゲノミックサザン分析

- 本発明のコレクチンの遺伝子が、他の動物種において保存されているか否かを明らかにするために、ゲノミックサザン分析を実施した。

- ハイブリダイゼーション用プローブとしては、前記の新規コレクチンのcDNA配列のORFに相当する部分を、PCR DIGプローブ合成キット（ベリンガー・マンハイム社製）を用いてDIGラベルしたDNAプローブを用い、メンブレンは、ZOO-BLOT（クローンテック社製）を用いて実施した。
- このメンブレンは、（a）ヒト（胎盤）、（b）サル（Rhesus）（腎臓）、（c）ラット（Sprague-Dawley）（腎臓）、（d）マウス（Balb/c）（腎臓）、（e）イヌ（腎臓）、（f）ウシ（腎臓）、（g）ウサギ（腎臓）及び（h）ニワトリ（肝臓）から得られたゲノムDNAをそれぞれ4 $\mu$ gずつ、制限酵素EcoRIで処理し、アガロースゲルで電気泳動した後に、電荷が改変されたナイロンメンブレンに転写し、UV照射により固定処理を施したものである。

- 以上のプローブとメンブレンを用いて、下記の工程に従ってハイブリダイゼーションを行った。まず2 x SSCにメンブレンを5分間浸し、10 mlのExpressHyb Hybridization Solution中で65°Cにて30分間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、前記と同様に凍結処理されたプローブをExpressHyb Hybridization Solutionで10 ng/mlとなるように希

積し、この溶液2 mlを用いて、65℃にて1時間ハイブリダイゼーションを行った。

- 5       ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄は、2x SSC、0.1% SDS 溶液20 mlで室温にて5分間2回振盪し、続いて0.2 x SSC、0.1% SDS溶
- 10       液20 mlで68℃にて15分間ずつ2回振盪しながら行った。SDSを除去する ために、DIG緩衝液Iで室温にて1分間2回洗浄し、次に50 mlのDIG緩衝 液II'で、室温にて1時間ブロッキングを行った。次いで、0.2% Tween 20を含むDIG緩衝液Iで5000倍に希釈しておいた抗DIGアルカリホスファ
- 15       ターゼ標識抗体を10 ml用いて30分間処理し、0.2% Tween20を含むDIG緩 衝液Iを50 ml用い室温にて20分間、振盪しながら洗浄を2回行った。
- 20       10 mlのDIG緩衝液IIIに室温にて3分間2回浸した後、メンブレンをハイ ブリバックに移し、DIG緩衝液IIIで100倍に希釈しておいたCSPDを全体に ゆきわたるように延ばし、インスタントフィルム57上で感光させた。

- 25       この結果を図10に示すが、ニワトリ（レーンh）を除くすべてのレ ーンにおいてシグナルが認められることから、本発明のコレクチン遺伝 子は、哺乳類において保存されていることが明らかとなった。

#### 実施例8：新規コレクチンの遺伝学的解析

- 30       得られたコレクチンのDNA配列に基づき、既知のコレクチンとの遺伝的 位置付けを明らかにするために解析を行い、遺伝的系統樹を作成した。
- 35       解析の対象としたコレクチンは、ヒトMBP（マンナン結合タンパク質） 、ヒトSP-A（サーファクタントタンパク質A）、ラットMBP-A、ラット MBP-C、ラットSP-D、マウスMBP-A、マウスMBP-C、ウサギMBP、サルMBP-A、サルMBP-C、ウシSP-D、ウシMBP、ウシコングルチニン（bKg）、ウシ コレクチン43（CL43）であり、GenBankデータベースからそれぞれのアミノ
- 40       酸配列を検索し、得られたデータをもとにレクチンドメインを含む領域 を用いてclustalw法でマルチプル・アラインメントを作成し、それらを

もとにN-J法を用い、Phylip Version 3.57c packageプログラムを用いて遺伝的系統樹を作成した。

- 5       その結果を図11に示すが、SP-D、ウシコレクチン43及びウシコング  
ルチニンで1つのクラスターを形成し、さらにMBP及びSP-Aでそれぞれ別  
々にクラスターを形成していたが、本発明のコレクチン遺伝子はこれら  
のいずれのクラスターにも属していないことが示された。従って、本発  
明のコレクチンは、従来報告されているコレクチンとは遺伝的に異なる  
クラスターを形成するものと推測された。

10       [産業上の利用可能性]

- 以上説明したように、本発明によってコレクチンに特徴的な構造を有  
し、従来報告されているものとは異なる新規のコレクチン遺伝子及びタ  
ンパク質が提供される。これらは、特にヒトの体内で抗細菌、抗ウイル  
ス活性などを発揮することが期待され、医薬品用途への応用が可能であ  
15       り、さらに生体防御機構の解明にも有用である。

## 請求の範囲

1. 以下のアミノ酸配列すなわち、

Met-Asn-Gly-Phe-Ala-Ser-Leu-Leu-Arg-Arg-Asn-Gln-Phe-Ile-Leu-Leu-  
5 Val-Leu-Phe-Leu-Leu-Gln-Ile-Gln-Ser-Leu-Gly-Leu-Asp-Ile-Asp-Ser-  
Arg-Pro-Thr-Ala-Glu-Val-Cys-Ala-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Pro-  
Lys-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Glu-Glu-Gly-Lys-His-  
Gly-Lys-Val-Gly-Arg-Met-Gly-Pro-Lys-Gly-Ile-Lys-Gly-Glu-Leu-Gly-  
Asp-Met-Gly-Asp-Arg-Gly-Asn-Ile-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Lys-  
1 0 Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Glu-Lys-Gly-Leu-Leu-Gly-Ile-Pro-Gly-Glu-Lys-  
Gly-Lys-Ala-Gly-Thr-Val-Cys-Asp-Cys-Gly-Arg-Tyr-Arg-Lys-Phe-Val-  
Gly-Gln-Leu-Asp-Ile-Ser-Ile-Ala-Arg-Leu-Lys-Thr-Ser-Met-Lys-Phe-  
Val-Lys-Asn-Val-Ile-Ala-Gly-Ile-Arg-Glu-Thr-Glu-Glu-Lys-Phe-Tyr-  
Tyr-Ile-Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Asn-Tyr-Arg-Glu-Ser-Leu-Thr-His-Cys-  
1 5 Arg-Ile-Arg-Gly-Gly-Met-Leu-Ala-Met-Pro-Lys-Asp-Glu-Ala-Ala-Asn-  
Thr-Leu-Ile-Ala-Asp-Tyr-Val-Ala-Lys-Ser-Gly-Phe-Phe-Arg-Val-Phe-  
Ile-Gly-Val-Asn-Asp-Leu-Glu-Arg-Glu-Gly-Gln-Tyr-Met-Phe-Thr-Asp-  
Asn-Thr-Pro-Leu-Gln-Asn-Tyr-Ser-Asn-Trp-Asn-Glu-Gly-Glu-Pro-Ser-  
Asp-Pro-Tyr-Gly-His-Glu-Asp-Cys-Val-Glu-Met-Leu-Ser-Ser-Gly-Arg-  
2 0 Trp-Asn-Asp-Thr-Glu-Cys-His-Leu-Thr-Met-Tyr-Phe-Val-Cys-Glu-Phe-  
Ile-Lys-Lys-Lys-Lys (配列番号：2)

からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

2. 以下の塩基配列すなわち、

2 5 cagcaatgaa tggctttgca tctttgcttc gaagaaacca atttatectc  
ctggtaactat ttcttttgcga aattcagagt ctgggtctgg atattgatag

ccgiccetacc gctgaagtct gtgccacaca cacaatttca ccaggacceca  
aaggagatga tggtgaaaaa ggagatccag gagaagaggg aaagcatgge  
aaagtgggac gcatggggcc gaaaggaatt aaaggagaac tgggtgatat  
gggagatcgg ggcaatattg gcaagactgg gcccatctggg aagaagggtg  
5 acaaagggga aaaaggtttg cttggaatac ctggagaaaa aggcaaagca  
ggtactgtct gigtattigg aagataccgg aaatttgttg gacaactgga  
tattagtatt gcccggtcga agacatctat gaagtttgtc aagaatgtga  
tagcagggat tagggaaact gaagagaaat tctactacat cgtgcaggaa  
gagaagaact acagggaate cctaaccac tgcaggattc ggggtggaat  
1 0 gctagccatg cccaaggatg aagctgccaa cacactcacc gctgactatg  
ttgccaagag tggtttcttt cgggtgttca ttggcgtgaa tgaccttgaa  
agggaggggac agtacctgtt cacagacaac actccactgc agaactatag  
cnaactggaat gagggggaac ccagcgacce ctatggatcat gaggactgtg  
tggagatgct gagctctggc agatggaatg acacagagtg ccatcttacc  
1 5 atgtactttg tctgtgagtt catcaagaag aaaaagtaac tteccctacc  
ctacgtattt gctattttcc tgtgaccgtc attacagtta ttgttatcca  
tctttttttt cctgatttga ctacatttga tctagtgcaa catagctaga  
aatgtctaaa ctgaggatg gagectccat catcatgctc ttttgtatg  
atttcatat ttccacacat ggtatgttat tgaccaata actcgccagg  
2 0 ttacatgggt cttgagagag aattttaatt actaattgtg cagagatag  
ttggttgtct atatgtcaaa tgagtgttc tcttggtatt tgetctacca  
tctctcccta gageactctg tgtctatecc agtggataat tteccagttt  
actggtgatg attaggaagg ttgttgatgg ttaggctaac ctgccctggc  
ccaaagccag acatgtacaa gggctttctg tgagcaatga taagatcttt  
2 5 gaatccaaga tgeccagatg ttttaccagt cacacctat ggccatggct  
atacttggaa gtctctcttg ttggcacaga catagaaatg ctttaacccc

aagcctttat atgggggact tctagctttg tgtcttgttt cagaccatgt  
 ggaatgataa atactctttt tgtgcttctg atctategat ttactaaca  
 tataccaagt aggtgctttg aaccccttct tgtaggetca caccttaate  
 tcaggeccct atatagtcac actttagttt aagaaaaacg gagec

5 (配列番号 : 1) で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド。

3. 以下のアミノ酸配列すなわち、

Glu-Lys-Cys-Val-Glu-Met-Tyr-Thr-Asp-Gly-Lys-Trp-Asn-Asp-Arg-Asn-  
 Cys-Leu-Gln-Ser-Arg-Leu-Ala-Ile-Cys-Glu-Phe (配列番号 : 3)

10 で示される、コレクチンタンパク質のコンセンサス配列と高い相同性を  
 有する遺伝子クローンに基づいて作製されたプローブと、ストリンジェ  
 ントな条件下でハイブリダイズすることができ、且つコレクチンタンパ  
 ク質をコードするポリヌクレオチド。

4. 前記プローブが、以下の塩基配列すなわち、

ttttagatggaggtccatacc (配列番号 : 7) 及び

15 ctgccaacacactcctcgtg (配列番号 : 8)

で示される塩基配列を有するプライマーを用いて行ったPCR反応の増幅産  
 物である請求の範囲第3項記載のポリヌクレオチド。

20 5. 請求の範囲第1乃至4項のいずれかに記載のポリヌクレオチドと  
 ストリンジェントな条件下でハイブリダイズでき、該ポリヌクレオチド  
 によってコードされるタンパク質が、(1)  $Ca^{2+}$  要求性の糖認識領域  
 (CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び(4) シス  
 テインを含むN末端領域を含む、ヒトコレクチンタンパク質であるポリ  
 ヌクレオチド。

25 6. 前記ポリヌクレオチドが、cDNAである請求の範囲第1乃至5項の  
 いずれかに記載のポリヌクレオチド。

7. 請求の範囲第3乃至6項のいずれかに記載のポリヌクレオチドに



よってコードされるコレクチンタンパク質。

8. 以下のアミノ酸配列すなわち、

Met-Asn-Gly-Phe-Ala-Ser-Leu-Leu-Arg-Arg-Asn-Gln-Phe-Ile-Leu-Leu-  
Val-Leu-Phe-Leu-Leu-Gln-Ile-Gln-Ser-Leu-Gly-Leu-Asp-Ile-Asp-Ser-  
5 Arg-Pro-Thr-Ala-Glu-Val-Cys-Ala-Thr-His-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Pro-  
Lys-Gly-Asp-Asp-Gly-Glu-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Glu-Glu-Gly-Lys-His-  
Gly-Lys-Val-Gly-Arg-Met-Gly-Pro-Lys-Gly-Ile-Lys-Gly-Glu-Leu-Gly-  
Asp-Met-Gly-Asp-Arg-Gly-Asn-Ile-Gly-Lys-Thr-Gly-Pro-Ile-Gly-Lys-  
Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Glu-Lys-Gly-Leu-Leu-Gly-Ile-Pro-Gly-Glu-Lys-  
1 0 Gly-Lys-Ala-Gly-Thr-Val-Cys-Asp-Cys-Gly-Arg-Tyr-Arg-Lys-Phe-Val-  
Gly-Gln-Leu-Asp-Ile-Ser-Ile-Ala-Arg-Leu-Lys-Thr-Ser-Met-Lys-Phe-  
Val-Lys-Asn-Val-Ile-Ala-Gly-Ile-Arg-Glu-Thr-Glu-Glu-Lys-Phe-Tyr-  
Tyr-Ile-Val-Gln-Glu-Glu-Lys-Asn-Tyr-Arg-Glu-Ser-Leu-Thr-His-Cys-  
Arg-Ile-Arg-Gly-Gly-Met-Leu-Ala-Met-Pro-Lys-Asp-Glu-Ala-Ala-Asn-  
1 5 Thr-Leu-Ile-Ala-Asp-Tyr-Val-Ala-Lys-Ser-Gly-Phe-Phe-Arg-Val-Phe-  
Ile-Gly-Val-Asn-Asp-Leu-Glu-Arg-Glu-Gly-Gln-Tyr-Met-Phe-Thr-Asp-  
Asn-Thr-Pro-Leu-Gln-Asn-Tyr-Ser-Asn-Trp-Asn-Glu-Gly-Glu-Pro-Ser-  
Asp-Pro-Tyr-Gly-His-Glu-Asp-Cys-Val-Glu-Met-Leu-Ser-Ser-Gly-Arg-  
Trp-Asn-Asp-Thr-Glu-Cys-His-Leu-Thr-Met-Tyr-Phe-Val-Cys-Glu-Phe-  
2 0 Ile-Lys-Lys-Lys-Lys (配列番号：2)

で示されるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質。

9. 以下の塩基配列すなわち、

cagcaatgaa tggctttgca tcttgcttc gaagaaacca atttatectc  
ctggtactat ttcttttgca aattcagagt ctgggtctgg atattgatag  
2 5 ccgtectacc gctgaagtet gtgccacaca cacaattica ccaggaccca  
aaggagatga tgggtgaaaa ggagatccag gagaagaggg aaagcatggc

aaagtgggac gcatggggcc gaaaggaatt aaaggagaac tgggtgatat  
 gggagategg ggcaatattg gcaagactgg gcccattggg aagaagggtg  
 acaaagggga aaaaggtttg ctiggaatac ctggagaaaa aggcaaagca  
 ggtactgtct gigtattgtg aagataccgg aaatttgttg gacaactgga  
 5 tattagtatt gcccggctca agacatctat gaagtttgtc aagaatgtga  
 tagcagggat tagggaaact gaagagaaat tctactacat cgtgcaggaa  
 gagaagaact acagggaate cctaaccac tgcaggattc ggggtggaat  
 gctagccatg cccaaggatg aagctgcca cactcctc gctgactatg  
 ttgccaagag tggcttcttt cgggtgttca ttggcgtgaa tgacctgaa  
 1 0 agggagggac agtacctgtt cacagacaac actccactgc agaactatag  
 caactggaat gagggggaac ccagcgacce ctatggctat gaggactgtg  
 tggagatgct gagctctggc agatggaatg acacagagtg ccatcttacc  
 atgtactttg tctgtgagtt catcaagaag aaaaagtaac ttcctcctc  
 ctactgtttt gctattttcc tgtgaccgtc attacagtta ttgttatcca  
 1 5 tctttttttt cctgattgta ctacattga tctgagtcaa catagctaga  
 aaatgctaaa ctgaggtatg gagectccat cactatgctc ttttgtatg  
 attttcatat ttccacacat ggtatgttat tgaccaata actcgccagg  
 ttacatgggt ctgagagag aattttaatt actaattgtg cagagatag  
 ttggttgtct atatgtcaaa tgagttgttc tcttgggtatt tgetctacca  
 2 0 tctctcccta gagcactctg tgtctatccc agtggataat tcccagttt  
 actggtgatg attaggaagg ttgttgatgg ttaggctaac ctgccctggc  
 ccaaagccag acatgtacaa gggctttctg tgagcaatga taagatcttt  
 gaatecaaga tgcccagatg ttttaccagt cacacctat ggcatggct  
 atacttgga gttctccttg ttggcacaga catagaaatg ctttaacccc  
 2 5 aagcctttat atgggggact tctagctttg tgtcttgttt cagaccatgt  
 ggaatgataa atactctttt tgtgtctctg atctatcgat ttactaaca

tataccaagt aggtgctttg aaccctttc ttaggtca caccctaac

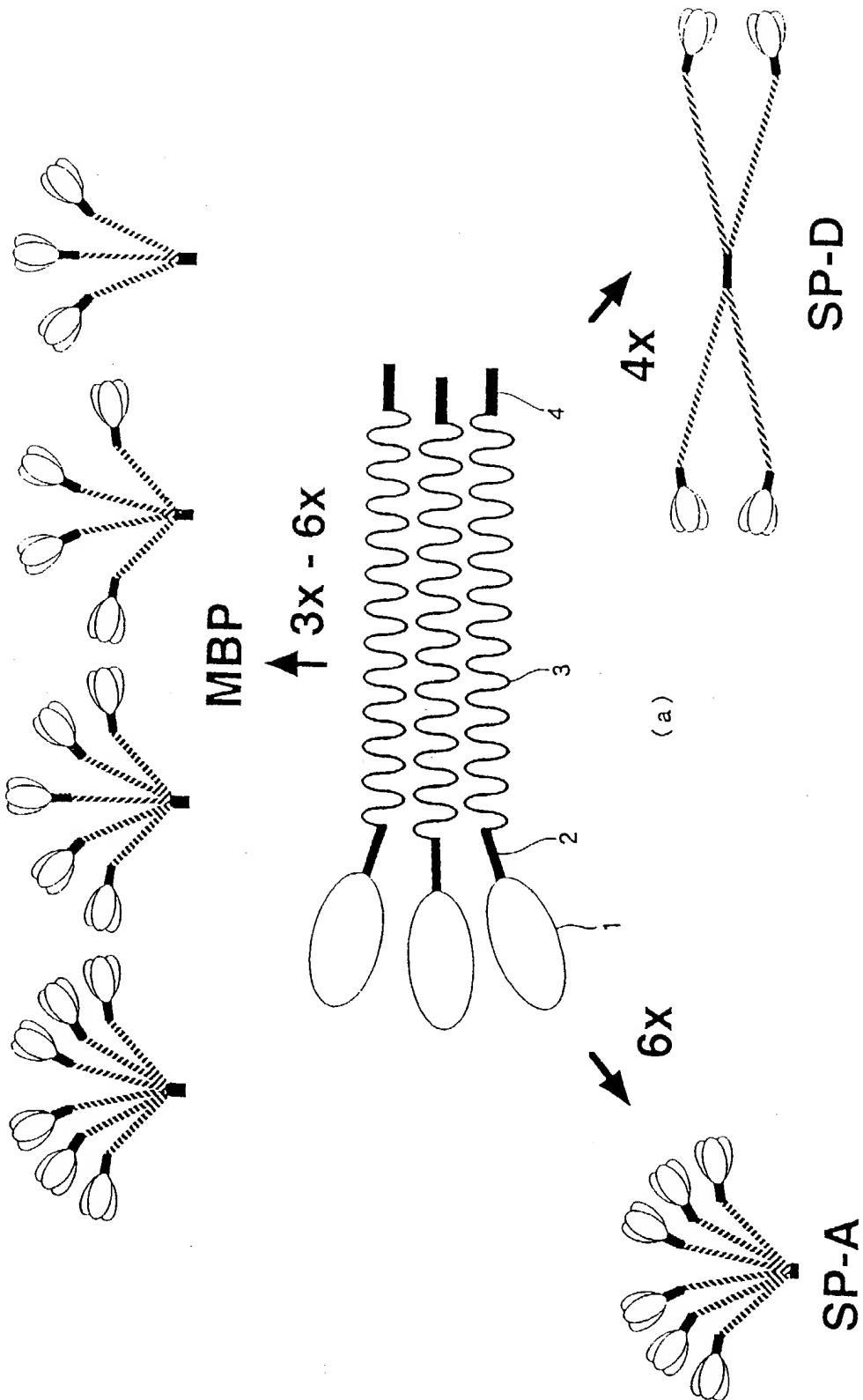
tcaggeccct atatagtcac actttgattt aagaaaaacg gagec

(配列番号 : 1) で示される塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含むコレクチンタンパク質。

- 5 10. 前記コレクチンタンパク質が、ヒト由来のコレクチンタンパク質である請求の範囲第7乃至9項のいずれかに記載のコレクチンタンパク質。

11. 請求の範囲第7乃至10項のいずれかに記載のコレクチンタンパク質のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が欠失、置換及び/または付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、(1)  $\text{Ca}^{2+}$  要求性の糖認識領域 (CRD)、(2) ネック領域、(3) コラーゲン様領域、及び(4) システインを含むN末端領域、を含むことを特徴とするコレクチンタンパク質。
- 10

1/11



2/11

MBP MSLFPS-LPLLLLSMVAASYSETVTCEDAQKT-----CPAIIACSS--PCINGFPCKDGRDGTKEGEPG  
SP-A MWLCPLALTLILMA-----ASGAACEVKDVCV-----GSPG  
SP-D MLIILL-SALVLLTQ-PLGYLEAEMKTYSHRTTPSACTLM-MCSSVESGLPCRDGRDGRGPRGEGDPPG 70

-----  
IPCTPGSHCLPGRDGR-----DGVKGDPPGPPMGPPG-----ETP-----  
LPGAAGQAGMPGQAGPVGPKGDNGSVGEPPGKGDITGPSPPGPPGVPAGREGLGKQGNIGPQKPGP 140

-----  
QGLRGLQGP-----PCKLGPPGNPGSPGSPGKQK  
-----CPPGNGLPGAPGVPE-----RGEKGEPPGERGPPGL-----  
KGEAGPKGEVGAPGMQGSAGARGLAGPKGERGVPGERGVPGNAGAAGSAGAMGPQGSPPGARPPGLKGDK 210

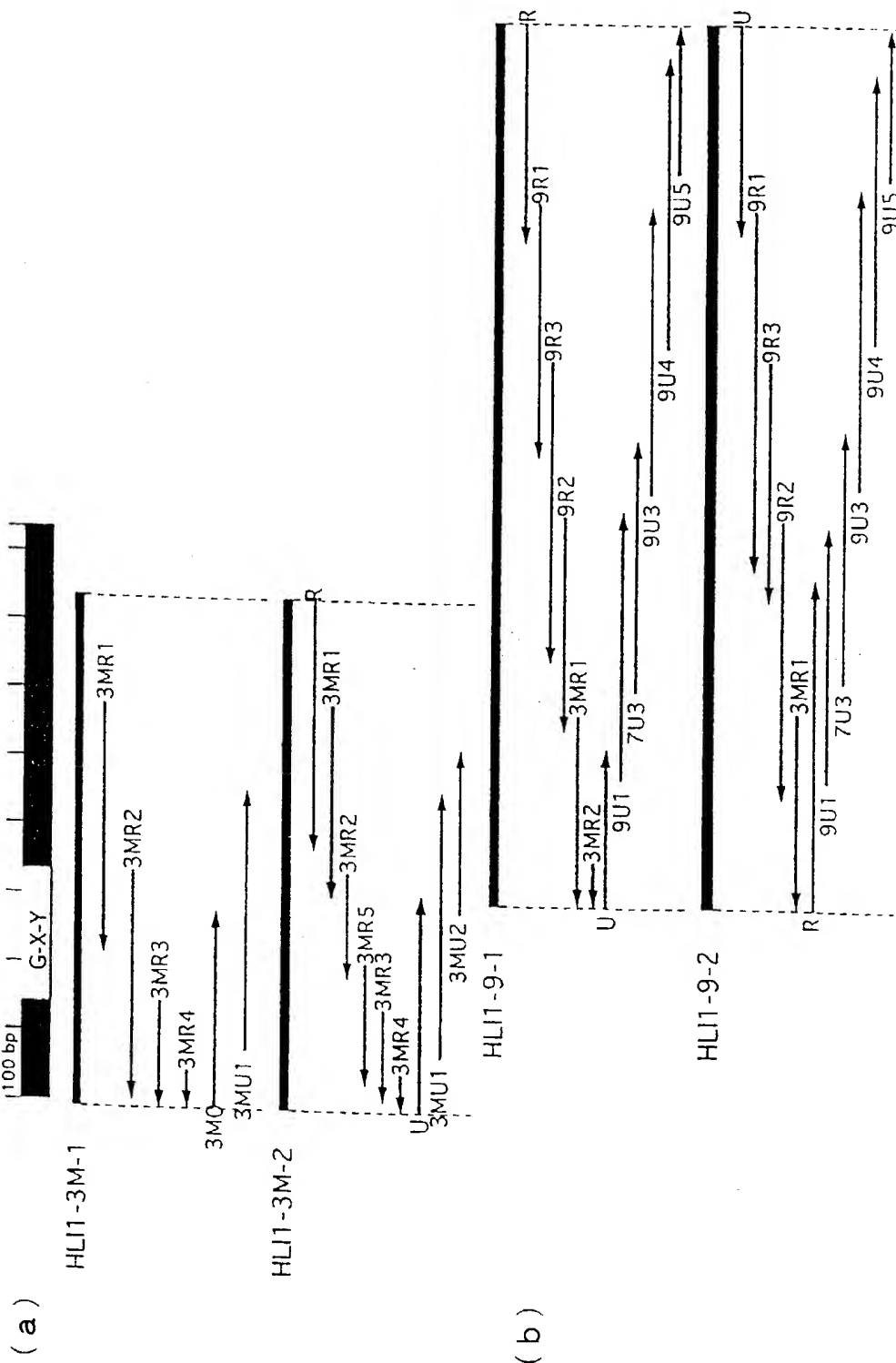
3/11

MBP           GDPG-KSPDGDSSLAA-----SERKALQTEMARIKKWLTFSLGKQVGNKFFLITNGEIMTFEKV  
 SP-A       --PAHLDEELQATLHD---FRHQILQTRGALS--LQGS I-----MTVGEKVFSSNGQSIITFD AI  
 SP-D       GIPGDKGAKGESGLPDVASLRQOQVEALQGVQHLQAAFSQYKKVELFPNGQSVGEKIFKTAGFVKPFTEA 280

KALCVKFQASVATPRNAAENGAIQNL I---KEEAFGLGITDEKTEGQFVVDLTGNRLTYTNWNEGEPNNAGS  
 QEACARAGGRIAMP RNPEENEIAASFVKKYNTYAYVGLTEGSPGDFRYSDGTPVNYTNWYRGEPAGRG-  
 QILCTQAGGQLASPRSAENAAALQQLVVAKNEAFLSM TDSKTEGKFTYPTGESLVYSNWAPGEPNDDGG 350

DEDCVLLLNKGQWNDVPQSTSHLAVCEFP I \*  
 KEQCVEMYTDGQWNDRNCLYSRLTICEF \*--  
 SEDCVEIFTNGKWNDRACGCKRLVVCEF \*--

4/11



5/11

MBP      MSLFPS-L---PLILLSMVAASYSETVTCEDAQKI---CPAVIACSS--PGINGFPCKDGRDGTKEKG  
SP-A      MWLOPLAL---LILMA---ASGAACEVKDVCV---G  
SP-D      MLLFIL-S---ALVLLTQ-PLGYLEAEMKTYSHRTTPSACTIV-MCSSVESGLPGRDGRDGRGPRGEGK  
新規コドン      MNGFASLLRRNQFILLVFLIQ-IQSLGLDIDSRPTAEVCAHTHTISP---GPKGDDG

70

EPG-----  
SPGIPGTPGSHGLPGRDGR---DGVKGDPPGPPGPMGPPG---ETP-----  
DGLPGAAGQAQMPGQAGPVGPKGDNCSVGEPPGKGDTPSGPPGPPGVPGPAGREGPLGKQGNIGPQGK  
EKGDPEEGKHG---KVGRM3PKGIKGELGDMGDRGNIKGTGPIGK-----

140

-----QGLRGLQGP-----PGKLGPPGPNPGPSGSPGPK  
-----CPPGNGLPGAPGVPE-----RKEGEPGERGPPGL-  
PGPKGEAGPKGEVGAFCMQGSACARGLAGPKGERGVPGERGVPGNAGAAGSAGAMGPQCSPGARGPPGLK  
---KGDKEKGLLGIPEKKGAG-----

210



6/11

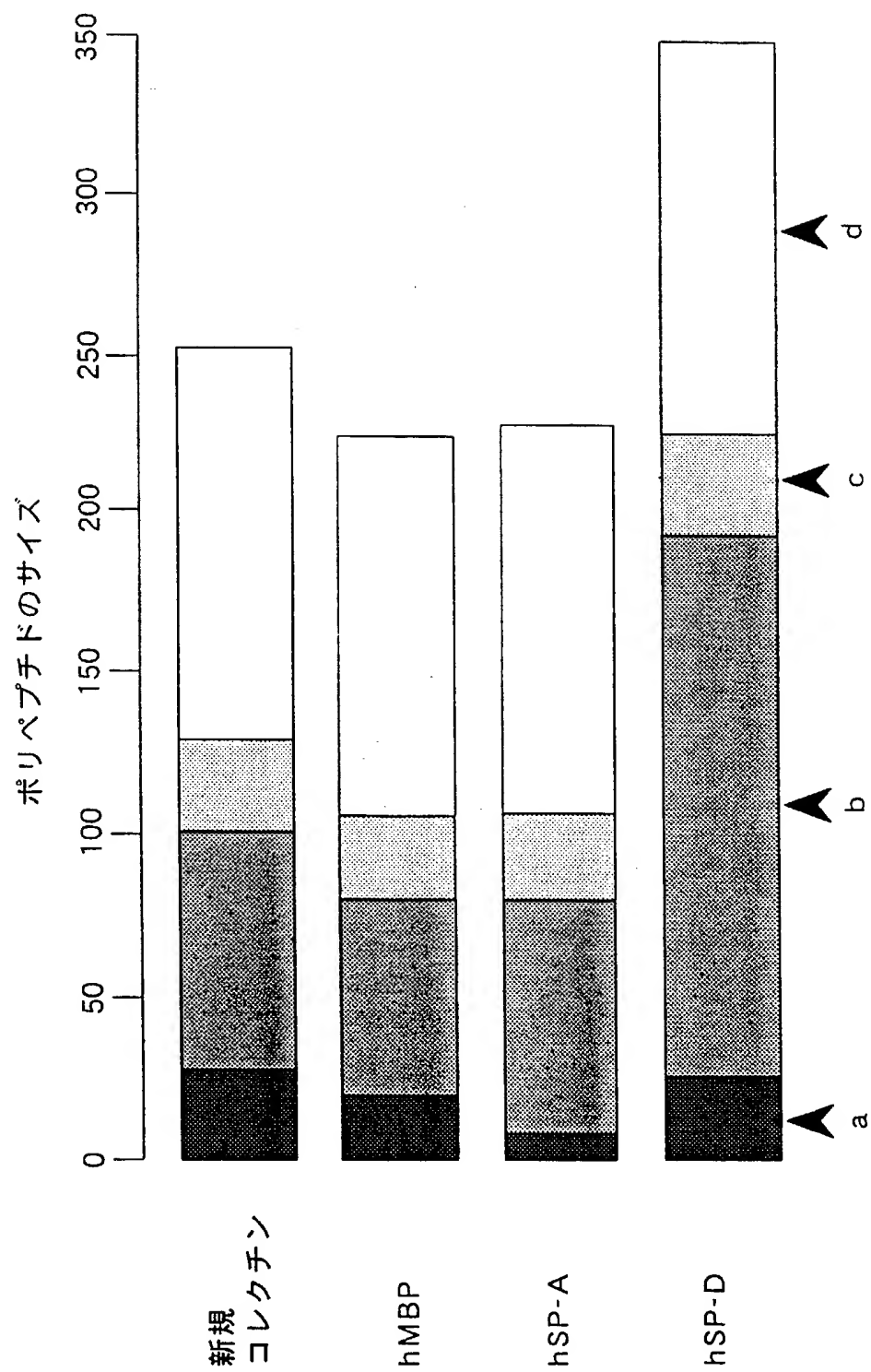
MBP GKGDPG-KSPDGDSSLA-----SERKALQTEMARIKKWLTFSLGKQVGNKFFLTNGEIMTF  
 SP-A -----PAHLDEELQATLHD-----FRHQILQTRGALS-LQGSIMTVGEKVFSNGQSITF  
 SP-D GKGIPGDKGAKGESGLPDVASLRQQVEALQGOVHQAASFQYKKVELFPNGQSVGEKIEKTAGFVKPF  
 -----TVCDGGRYRKFFVGQLDISIARLKTSMKFVN--VIAGIRETEKFFYIVQEEKNY 280

新規コドン

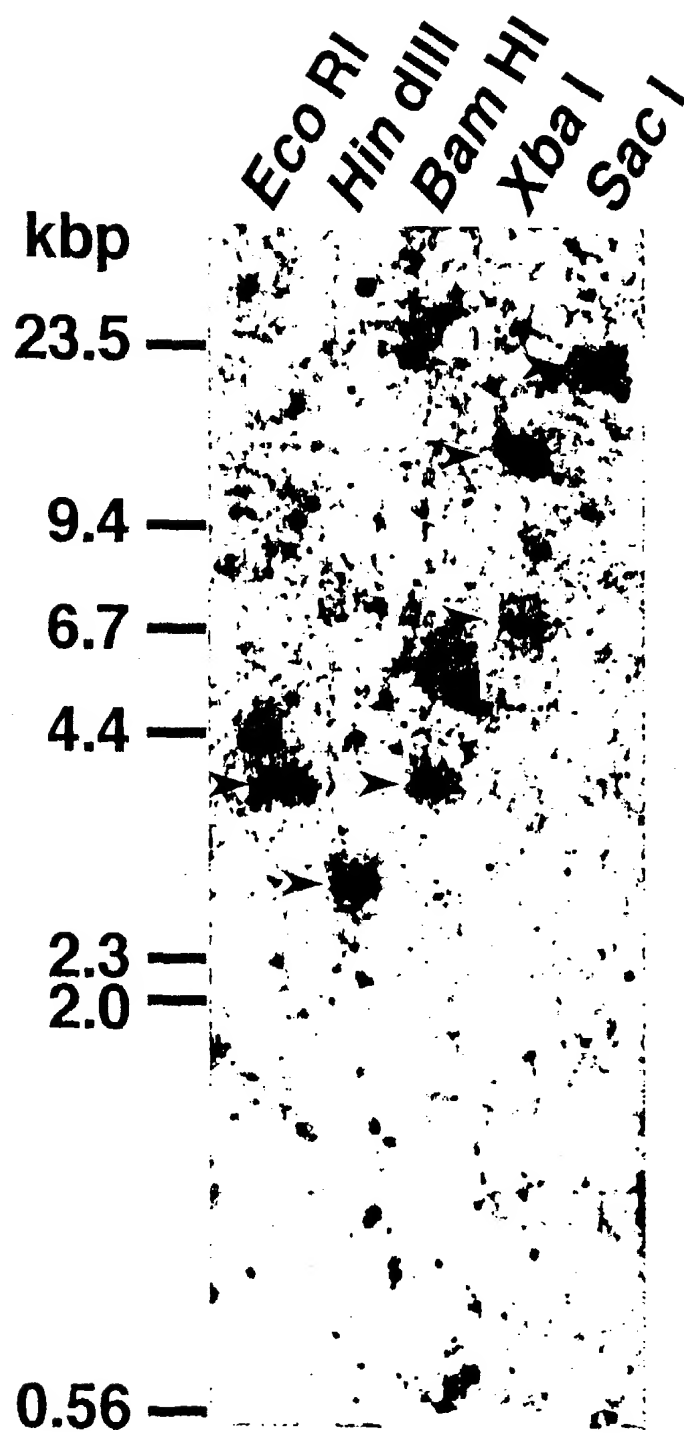
EKKVLCVKFQASVATPRNAAENGAIQNLI---KEE-AFLGITDEKTEGQFVDLTGNRLT-YTNWNEGEP  
 DAIQEAARAGGRIAVPRNPEENEAIASFVKKYNITY-AYVGLTEGSPGDFRYSDDGTPVN-YTNWYRGE  
 TEAQLLCTQAGGQLASPRSAEENALQOLVVAKNEA-AFLSMTDSKTEGKFTYPTGESLV-YSNWAPGEP  
 RESLTHCRIRGGMLAMPKDEAANTLIAADYVAKSGFFRVFIGVNDLEREGQYMFDTNTPLNYSNWNEGEP 350

NNAGSDEDCVLLLLKNGQWNDVPCSTSHLAVCEFP\*---  
 AGRG-KEQCCEMYTIDGQWNDNRNCLYSRLTICEF\*-----  
 NDDGGSDEDCVEIFTNCKWNDRAACGEKRLVCEF\*-----  
 SDPYGHEDCVEMLSGGRWNDTECHLIMYFVCEFIKKK\*

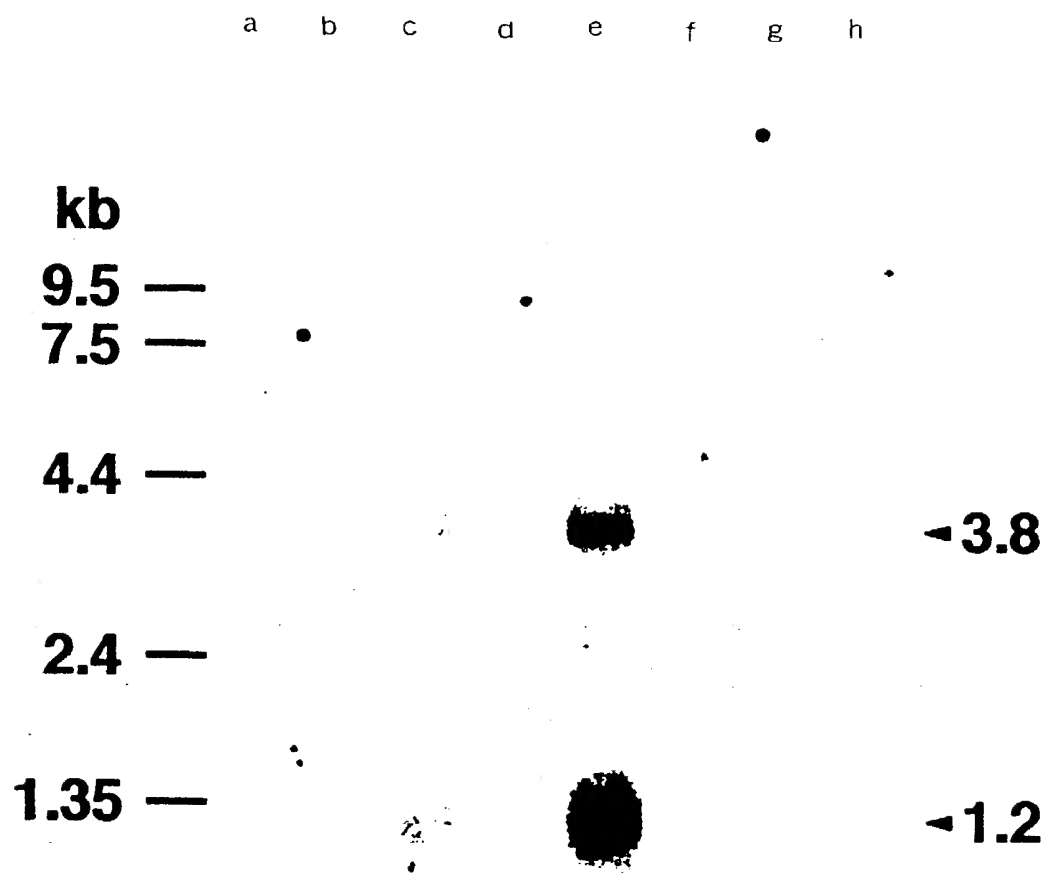
7/11



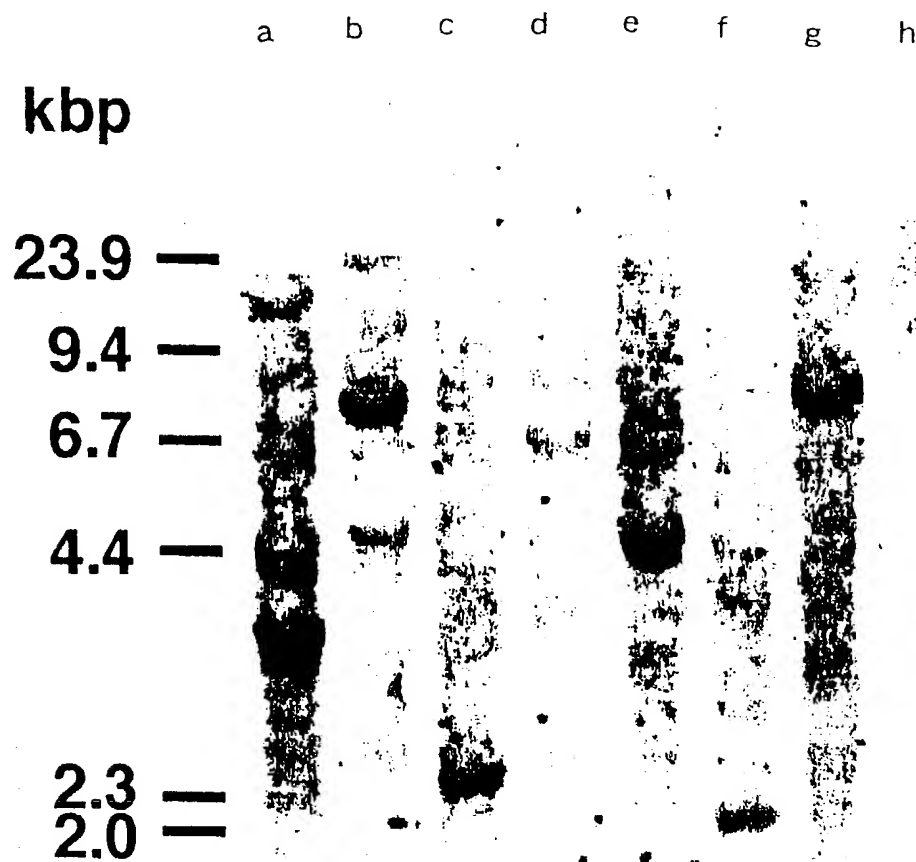
8/11



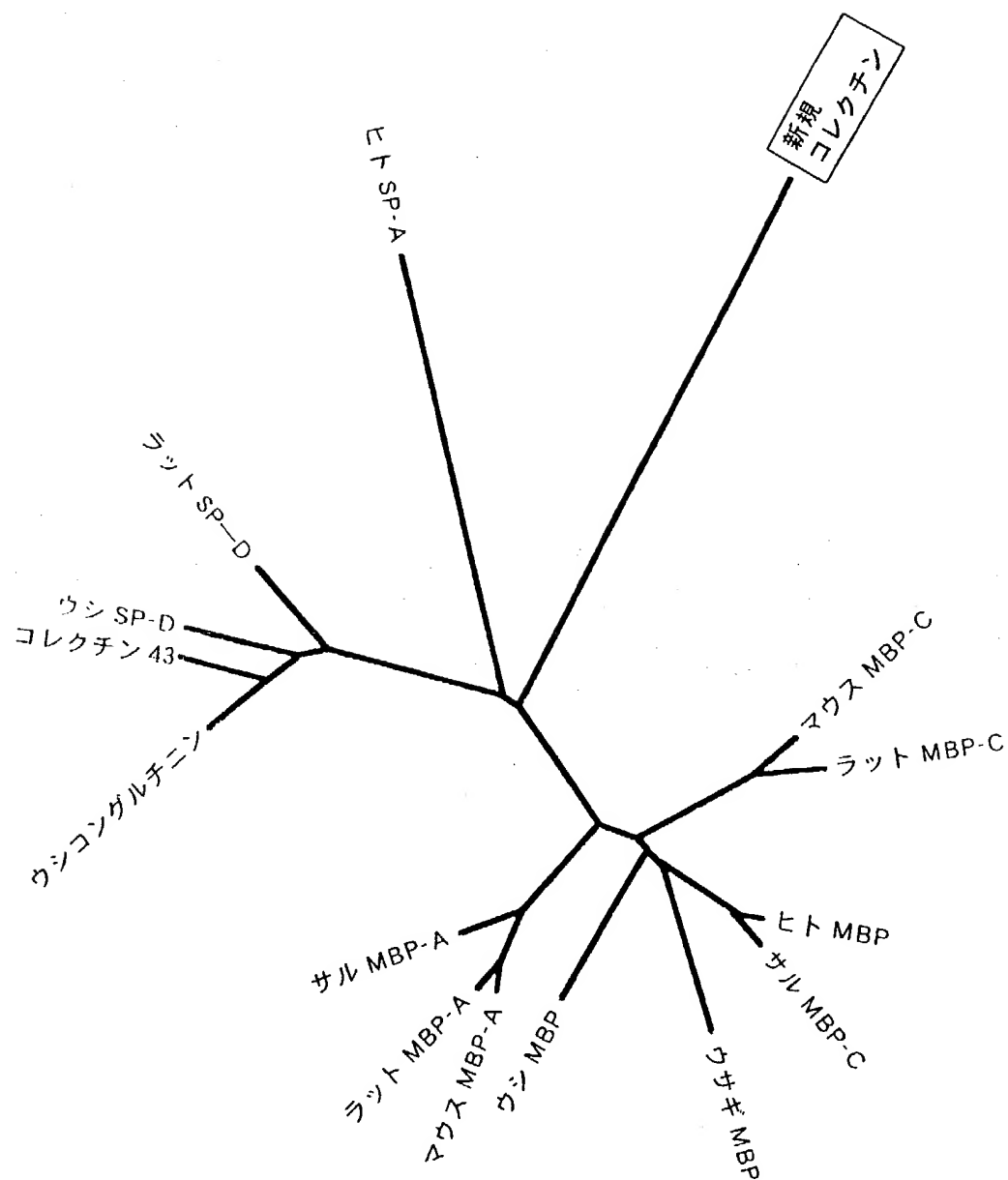
9/11



10/11



11/11



1 / 17  
SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Novel Collectin

<130> 98P069

<150> JP 10-11281

<151> 1998-01-23

<160> 26

<210> 1

<211> 1595

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (6).. (836)

<400> 1

cagca atg aat ggc ttt gca tcc ttg ctt cga aga aac caa ttt atc

-47-

Met Asn Gly Phe Ala Ser Leu Leu Arg Arg Asn Gln Phe Ile





## 3 / 17

aag ttt gtc aag aat gtg ata gca ggg att agg gaa act gaa gag aaa	479
Lys Phe Val Lys Asn Val Ile Ala Gly Ile Arg Glu Thr Glu Glu Lys	
145 150 155	
ttc tac tac atc gtg cag gaa gag aag aac tac agg gaa tcc cta acc	527
Phe Tyr Tyr Ile Val Gln Glu Glu Lys Asn Tyr Arg Glu Ser Leu Thr	
160 165 170	
cac tgc agg att cgg ggt gga atg cta gcc atg ccc aag gat gaa gct	575
His Cys Arg Ile Arg Gly Gly Met Leu Ala Met Pro Lys Asp Glu Ala	
175 180 185 190	
gcc aac aca ctc atc gct gac tat gtt gcc aag agt ggc ttc ttt cgg	623
Ala Asn Thr Leu Ile Ala Asp Tyr Val Ala Lys Ser Gly Phe Phe Arg	
195 200 205	
gtg ttc att ggc gtg aat gac ctt gaa agg gag gga cag tac atg ttc	671
Val Phe Ile Gly Val Asn Asp Leu Glu Arg Glu Gly Gln Tyr Met Phe	
210 215 220	
aca gac aac act cca ctg cag aac tat agc aac tgg aat gag ggg gaa	719
Thr Asp Asn Thr Pro Leu Gln Asn Tyr Ser Asn Trp Asn Glu Gly Glu	
225 230 235	
ccc agc gac ccc tat ggt cat gag gac tgt gtg gag atg ctg agc tct	767
Pro Ser Asp Pro Tyr Gly His Glu Asp Cys Val Glu Met Leu Ser Ser	
240 245 250	
ggc aga tgg aat gac aca gag tgc cat ctt acc atg tac ttt gtc tgt	815
Gly Arg Trp Asn Asp Thr Glu Cys His Leu Thr Met Tyr Phe Val Cys	
255 260 265 270	

4 / 17

gag ttc atc aag aag aaa aag taacttccct cactctacgt atttgetatt 866

Glu Phe Ile Lys Lys Lys Lys

275

tacctgtgac cgtcattaca gtiattgtta tccatccctt tttacctgat tgtactacat 926

ttgatctgag tcaacatage tagaaaatgc taaactgagg tatggagcct ccatcactat 986

gctcttttgt gatgatttcc atattttcac acatggatat ttattgaccc aataactcgc 1046

caggttacct gggctctgag agagaatttt aattactaat tgtgcacgag atagttaggt 1106

gtctataatgt caaatgagtt gtctctctgg tatttgctct accatctctc cctagagcac 1166

tcctgtctca tcccagtga taatttccca gtttactggt gatgattagg aaggttcttg 1226

atggtttagc taacctgccc tggcccaaag ccagacatgt acaagggtt tctgtgagca 1286

atgataagat ctttgaatcc aagaatgcca gatgttttac cagtcacacc ctatggccat 1346

ggctatactt ggaagttctc cttgttggca cagacataga aatgctttaa ccccaagcct 1406

ttatatgggg gacttctagc ttgtgtctt gtttcagacc atgtggaatg ataaatactc 1466

ttttgtgct tctgaatctat cgatttccat aacatatacc aagtaggtgc ttgaacccc 1526

tttctgtagg ctacacacct aatctcagge cctatatag tcacacttg atttaagaaa 1586

aacggagcc 1595

<210> 2

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Met Asn Gly Phe Ala Ser Leu Leu Arg Arg Asn Gln Phe Ile Leu Leu

1

5

10

15

5 / 17

Val Leu Phe Leu Leu Gln Ile Gln Ser Leu Gly Leu Asp Ile Asp Ser

20

25

30

Arg Pro Thr Ala Glu Val Cys Ala Thr His Thr Ile Ser Pro Gly Pro

35

40

45

Lys Gly Asp Asp Gly Glu Lys Gly Asp Pro Gly Glu Glu Gly Lys His

50

55

60

Gly Lys Val Gly Arg Met Gly Pro Lys Gly Ile Lys Gly Glu Leu Gly

65

70

75

80

Asp Met Gly Asp Arg Gly Asn Ile Gly Lys Thr Gly Pro Ile Gly Lys

85

90

95

Lys Gly Asp Lys Gly Glu Lys Gly Leu Leu Gly Ile Pro Gly Glu Lys

100

105

110

Gly Lys Ala Gly Thr Val Cys Asp Cys Gly Arg Tyr Arg Lys Phe Val

115

120

125

Gly Gln Leu Asp Ile Ser Ile Ala Arg Leu Lys Thr Ser Met Lys Phe

130

135

140

Val Lys Asn Val Ile Ala Gly Ile Arg Glu Thr Glu Glu Lys Phe Tyr

145

150

155

160

Tyr Ile Val Gln Glu Glu Lys Asn Tyr Arg Glu Ser Leu Thr His Cys

165

170

175

Arg Ile Arg Gly Gly Met Leu Ala Met Pro Lys Asp Glu Ala Ala Asn

180

185

190

Thr Leu Ile Ala Asp Tyr Val Ala Lys Ser Gly Phe Phe Arg Val Phe

195

200

205

Ile Gly Val Asn Asp Leu Glu Arg Glu Gly Gln Tyr Met Phe Thr Asp

210

215

220

6 / 17

Asn Thr Pro Leu Gln Asn Tyr Ser Asn Trp Asn Glu Gly Glu Pro Ser

225

230

235

240

Asp Pro Tyr Gly His Glu Asp Cys Val Glu Met Leu Ser Ser Gly Arg

245

250

255

Trp Asn Asp Thr Glu Cys His Leu Thr Met Tyr Phe Val Cys Glu Phe

260

265

270

Ile Lys Lys Lys Lys

275

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Consensus sequence of collectins which were reported  
heretofore.

&lt;400&gt; 3

Glu Lys Cys Val Glu Met Tyr Thr Asp Gly Lys Trp Asn Asp Arg Asn

5

10

15

Cys Leu Gln Ser Arg Leu Ala Ile Cys Glu Phe

20

25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 14

7 / 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Pre-sequence of an Insert.

&lt;400&gt; 4

gaattcggca cgag

14

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M13 Universal Primer Sequence for Sequencing.

&lt;400&gt; 5

cgacgttgta aaacgacggc cagt

24

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

8 / 17

&lt;223&gt; M13 Reverse Primer Sequence for Sequencing.

&lt;400&gt; 6

caggaaaca gctatgac

17

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a Reverse Primer for Screening a Novel  
Collectin.

&lt;400&gt; 7

ttttgatgga ggctccatac c

21

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a Forward Primer for Screening a Novel  
Collectin.

<400> 8

ctgccaacac actcctcgt g

21

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a  $\lambda$ gt11 Reverse Primer for Sequencing.

<400> 9

ttgacaccag accaactggt aatg

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a  $\lambda$ gt11 Forward Primer for Sequencing.

<400> 10

ggtggcgacg actcctggag cccg

24

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 11

taatggtagc gaccggcgct

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 12

aaaccaattt atactcctgg

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 13

aatattggca agactgggcc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 14

gatgagtgtg ttggcagcat

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 15

gtatcttcca caateacaga

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 16

ttaattcctt tcggccceat

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel

Collectin.

<400> 17

gcaaaagaaa tagtaccagg

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel

Collectin.

<400> 18

catatcaccc agttctctt

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel

Collectin.

14 / 17

&lt;400&gt; 19

agcagggatt agggaaactg

20

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

&lt;400&gt; 20

ctgtgagcgt cattacagt

20

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

&lt;400&gt; 21

ggttgtctat atgtcaa

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 22

tatggccatg gctatacttg

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 23

atcgctgac tatgttgccaa

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 24

caagtatagc catggccata

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 25

aactgtaatg acgctcacag

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of a Synthetic Primer for Sequencing a Novel  
Collectin.

<400> 26

catttgacat atgaacaacc

20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP98/03328

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, A01N63/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, A01N63/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
DDBJ/GenBank/EMBL, WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAWAI, T. et al., "Cloning and characterization of a cDNA encoding bovine mannan-binding protein", Gene (1997) Vol. 186, No. 2, p.161-165	1-11
A	NEPOMUCENO, R.R. et al., "cDNA cloning and primary structure analysis of ClqR(P) . . .", Immunity (1997) Vol. 6, No. 2, p.119-129	1-11
A	LIPSCOMBE, R.J. et al., "Mutations in the human mannose-binding gene: frequencies in several population groups", Eur. J. Hum. Genet. (1996) Vol. 4, No. 1, p.13-19	1-11
A	LIM, B.L. et al., "Primary structure of bovine collection . . .", J. Biol. Chem. (1994) Vol. 269, No. 16, p.11820-11824	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
16 October, 1998 (16. 10. 98)

Date of mailing of the international search report  
27 October, 1998 (27. 10. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/03328

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12N15/12, C07K14/47, A01N63/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12N15/12, C07K14/47, A01N63/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 DDBJ/GenBank/EMBL, WPI (DIALOG),  
 MEDLINE (STN), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KAWAI, T. et al. "Cloning and characterization of a cDNA encoding bovine mannan-binding protein", Gene (1997) 第186巻, 第2号, p. 161-165	1-11
A	NEPOMUCENO, R. R. et al. "cDNA cloning and primary structure analysis of ClqR(P) ...", Immunity (1997) 第6巻, 第2号, p. 119-129	1-11
A	LIPSCOMBE, R. J. et al. "Mutations in the human mannose-binding gene: frequencies in several population groups", Eur. J. Hum. Genet. (1996) 第4巻, 第1号, p. 13-19	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.10.98

国際調査報告の発送日

27.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LIM, B. L. et al. "Primary structure of bovine collectin ...", J. Biol. Chem. (1994) 第269巻, 第16号 p. 11820-11824	1-11